

機関番号：14301
研究種目：基盤研究（A）
研究期間：2008～2011
課題番号：20249015
研究課題名（和文） レドックス感受性TRPチャネル群の炎症性細胞遊走における意義の分子医学的解明
研究課題名（英文） Medical and molecular elucidation of significance of redox-sensitive TRP channels in inflammatory cell migration
研究代表者
森 泰生 (MORI YASUO)
京都大学・工学研究科・教授
研究者番号：80212265

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：生体分子医学、炎症

1. 研究計画の概要

TRPM2 が活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) を感知、活性化開口する、レドックス感受性 Ca^{2+} 透過型チャネルを形成する (Hara, Mol. Cell, 2002年; 2月号 featured article)。また、TRPC1、TRPC4、及び TRPC5 チャネルが、PLC 活性化だけでなく、システイン残基酸化修飾により一酸化窒素 (NO) や ROS を感知して活性化開口し、 Ca^{2+} を流入させる (Yoshida, Nature Chem. Biol., 2006)。このように、高レドックス感受性を示す TRP チャネル群が細胞死との関連において研究されてきたが、生理的意義は依然として不明であり、解明が待たれていた。特に、TRPM2 は単球、好中球、T リンパ球、神経細胞等に豊富に発現しており、それらにおける生理的役割は不明であった。そこで、ROS シグナルと Ca^{2+} シグナルとの直接連関を担う TRPM2 チャネルによる、「炎症」における CXCL8 ケモカイン産生の制御機構とその意義の解明を行った。まず、ヒト U937 単球株 *in vitro* 培養系を主として用い、単球の ROS 依存性 CXCL8 (=IL-8) 産生における、 Ca^{2+} シグナルとレドックス感受性 MAP キナーゼ-NF κ B シグナル経路の TRPM2 による制御機構を明らかにした。また、作製に成功した TRPM2 ノックアウトマウスの *in vivo* 炎症モデルである潰瘍性大腸炎等を用い、CXCL2 (=MIP-2) 依存性の好中球浸潤における、TRPM2 の役割をつきとめた。

2. 研究の進捗状況

ヒト単球細胞株 U937 において、 H_2O_2 は TRPM2 を介した細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こし、CXCL8 産生を誘導した。CXCL8 産生は、細胞外液中の Ca^{2+} の除去および TRPM2

siRNA の処置により抑制されたことから、TRPM2 を介した細胞内への Ca^{2+} 流入が H_2O_2 による CXCL8 産生に関与すると考えられた。この CXCL8 産生誘導には転写因子 NF κ B およびシグナル伝達経路として、Erk が関与していることを確認した。Erk の活性化は TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入による Ca^{2+} 依存性チロシンキナーゼ Pyk2 の活性化と、それに伴う Ras の活性化を介していた。活性化 Erk が RelA の核内移行を惹起し、CXCL8 産生誘導を引き起こしていることも明らかにした。さらに、U937 で明らかにした TRPM2 の役割を *in vivo* で評価すべく、TRPM2 ノックアウトマウスを作製し、検討を進めたところ、Wild type (WT) マウスの末梢血から単離した単球における H_2O_2 による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇および ADP-ribose による電流の増大は、TRPM2 ノックアウト単球において消失した。マウスにおいてはヒト CXCL8 の機能上のホモログとして CXCL2 が知られているが、WT 単球において認められた H_2O_2 刺激による CXCL2 産生誘導が、TRPM2 KO 単球においてはその産生誘導が抑制された。以上から、 H_2O_2 により活性化された TRPM2 が、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こし、単球におけるケモカイン産生を調節していることが明らかとなった。

大腸炎とは異なる炎症病態への知見の拡大に成功した。即ちまず、冠状動脈結核と開放による梗塞再還流モデルを TRPM2 ノックアウトマウスに作成したところ、単球・マクロファージではなく好中球のロイコトリエン B4 への遊走が減弱し、心筋壊死が抑えられる結果が得られた。また、TRPM2 は Ca^{2+} 流入だけでなくリソソームからの Ca^{2+} 放出にも関与し、細胞死の調節を担うことが分か

ってきた。これは、TRPM2 の新たな機能的側面を示すものである。

3. 現在までの達成度

当研究計画は、当初の計画以上に進展している。この判断は、潰瘍性大腸炎におけるTRPM2 の役割を明らかにするという中心課題が既にまとめられ、一流の国際的ジャーナル (Nature Medicine) に発表されていることと、他の炎症病態への知見の拡大に成功しているだけでなく、Ca²⁺放出にも関与するというTRPM2の新たな機能的側面を示すことに成功したことに依拠している。

4. 今後の研究の推進方策

他の炎症病態への知見の拡大を進め、Ca²⁺放出にも関与するTRPM2の新たな機能的側面を理解する研究を進め、レドックス感受性TRPM2というユニークなCa²⁺チャネルの炎症を中心とした生理的役割を明確にしてい くつもりである。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

① Bogeski I, Kummerow C, Al-Ansary D, Koehler R, Schwarz EC, Kozai D, Takahashi N, Peinelt C, Griesemer D, Bozem B, Mori Y, Hoth M & Niemeyer BA Differential redox regulation of ORAI channels: a mechanism to tune cellular calcium responses. *Science Signaling* 3, ra24 (2010). 査読有

② Numaga T, Nishida M, Kiyonaka S, Kato K, Katano K, Mori E, Kurosaki T, Inoue R, Hikida T, Putney Jr JW & Mori Y Ca²⁺ influx and protein scaffolding via TRPC3 sustain PKC γ and ERK activation in B cells. *J. Cell Sci.* 123, 927-938 (2010). 査読有

③ Sun H-S, Jackson MF, Martin LJ, Jansen K, Teves L, Cui H, Kiyonaka S, Mori Y, Jones M, Forder JP, Golde TE, Orser BA, MacDonald JF & Tymianski M. Suppression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia. *Nature Neurosci.* 12, 1300-1307 (2009). 査読有

④ Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I & Mori Y Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 5400-5405 (2009). 査読有

⑤ Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M, Takeshima H & Mori Y TRPM2-mediated Ca²⁺ influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nature Med.* 14, 738-747 (2008). 査読有